

INFLUENCIA DE DISTINTAS CITOCININAS EN EL CULTIVO "IN VITRO" DE APICES CAULINARES DE *Fragaria x ananassa* Y *F. virginiana*

Cristina B. Brutti (1), Marcela I. Sánchez (2) y O. H. Caso (3)

Rec: 3/8/83

Acep: 22/11/83

RESUMEN

Se estudió la respuesta de *Fragaria x ananassa* (2n = 8x) cv. Brighton, de día netro (reflorecente) y cv. Douglas, de día corto, y de *F. virginiana* clon UC11 (2n = 8x), de día corto, a distintas citocininas: 6- (4 - hidroxil - 3 metilbut - 2 - trans - enilamino) purina (Z), 6 - (γ - γ - dimetil - alil - amimo) purina (2iP), 6 - bencilaminopurina (BAP) y 6 - furfurilaminopurina (Kin), mediante el cultivo "in vitro" de ápices caulinares.

Se empleó el medio básico de Boxus (1974) suplementado con tiamina-HCl; ácido nicotínico; piridoxina-HCl; glicina; mio-inositol; glucosa, agar; $0,5 \times 10^{-6}$ M de ácido indolbutírico (IBA), $0,3 \times 10^{-6}$ M de ácido giberélico (GA₃) y 2×10^{-6} M de cada una de las citocininas citadas.

Pudo comprobarse en las citocininas citadas ensayadas una actividad diferencial en el proceso de morfogénesis. Así, BAP fue el compuesto más efectivo en la inducción de nuevas yemas y el único que inhibió la formación de raíces en ambas especies.

La mayor proliferación de callo basal se obtuvo con 2iP; Kin resultó la menos efectiva, y BAP y Z, efectos intermedios.

Además se observó que el efecto de las citocininas puede ser diferencial entre especies y/o cultivares. Así el número de hojas expandidas por explanto original fue significativamente diferente entre especies cuando se utilizó Z en el medio de cultivo y menor en los cv. de *F. x ananassa*. También se observaron diferencias entre estos cv., en el número de yemas formadas en presencia de BAP y 2iP; su diferenciación fue mayor en el cv. reflorecente.

EFFECTS OF DIFFERENT CYTOKININS ON "IN VITRO" GROWTH OF *Fragaria x ananassa* AND *F. virginiana* SHOOTS TIPS

SUMMARY

Four different cytokinins, 6 - (4 - hydroxy - 3 - methyl - but - 2 - trans - enylamino) purine (Z), 6 - (γ - γ - dimethyl - allylamino) purine (2iP), 6 - benzylaminopurine (BAP) and 6 - furfurylaminopurine (Kin), were screened for their morphogenetic activity through "in vitro" shoot tip culture. The basal medium was Boxus (1974), supplemented with pyridoxin-HCl; thiamine-HCl; nicotinic acid; myoinositol, glycine; glucose, agar; indole - 3 - butyric acid (IBA); $0,5 \times 10^{-6}$ M; gibberellic acid (GA₃) $0,3 \times 10^{-6}$ M and 2×10^{-6} M of each one of the cytokinins tested.

Two cultivars of *Fragaria x ananassa* Brighton (everbearing) and Douglas (seasonal) and *Fragaria virginiana* clone UC11 were tested. It could be seen that BAP was the most effective cytokinin to achieve bud differentiation and the only one which avoided root formation in both species. As to callusing, the largest basal callus proliferation was obtained with 2iP while Kin was the least effective and BAP and Z intermediate in their effects. Different cytokinin effects could be observed within not only species but also cultivars of the same species. The number of expanded leaves per initial explant was significantly lower in *Fragaria x ananassa* when Z was used. On the other hand, differences within cultivars were observed in the number of formed buds per initial explant using either BAP or 2iP, thus the everbearing cultivar showed the largest number of buds.

1) Becaria del CONICET Centro de Ecofisiología Vegetal, Serrano 665, 1414 Capital Federal.

2) Becaria del CONICET, Departamento de Botánica Agrícola, INTA, Villa Udaondo, Castelar, 1712 Buenos Aires.

3) Investigador Principal del CONICET, Centro de Ecofisiología Vegetal, Serrano 665, 1414 Capital Federal.

INTRODUCCION

El cultivo "in vitro" de ápices caulinares es ampliamente utilizado en micropropagación, y en la obtención de plantas libres de virus. En su cultivo se utilizan distintos balances de reguladores de crecimiento, con el objeto de canalizar la actividad meristemática hacia la formación de nuevas yemas, de raíces, o hacia la proliferación de callo. No sólo se observa un balance particular para cada especie (Kantha, 1981), sino que también existe una respuesta diferencial a los distintos compuestos de un mismo grupo hormonal (Lee y de Fossard, 1977; Beniest y Debergh, 1976), posiblemente relacionados con su estructura molecular (Latham, 1978).

Skoog y Armstrong (1970) estudiaron la relación entre estructura y actividad en citocininas, trabajando con callos de tabaco. Con posterioridad, se propusieron otros bioensayos (Latham, 1978) y se demostró que la actividad de las citoninas varía en función del explanto utilizado y de la respuesta biológica bajo estudio. Se desconocen las causas, pero podría atribuirse a diferencias en la absorción (Terrine *et al.*, 1970), metabolismo (Wang *et al.*, 1981), y requerimientos estructurales para la actividad en un determinado sitio de acción.

El género *Fragaria* incluye varias especies, de las cuales se cultivan numerosos híbridos, con diferentes respuestas fotoperiódicas (Pérez Afonso, 1979). En su cultivo "in vitro", la citocinina más empleada es la 6-bencilaminopurina (Boxus *et al.*, 1977).

El presente trabajo tiene por objeto determinar las respuestas al cultivo "in vitro" de ápices caulinares de *F x ananassa* Duch. cv. Brighton (reflorecente) y cv. Douglas (de día corto) y *F. virginiana* L. clon UC11 (de día corto), a una misma relación auxinas: citocininas, variando la citocininas ensayadas.

MATERIALES Y METODOS

Las especies utilizadas fueron *Fragaria x*

ananassa Duch. ($2n = 8x$) cv. Brighton (reflorecente) y cv. Douglas (de día corto), y *F. virginiana* L. ($2n = 8x$) clon UC11 (de día corto).

Las plantas de *F. virginiana* L., provistas por la Facultad de Ciencias Agrarias, UNC, fueron mantenidas en invernáculo con un fotoperíodo de 16 horas y una temperatura de $20 \pm 5^\circ\text{C}$; las correspondientes a los dos cultivares de *F x ananassa* Duch. provinieron del campo.

el material fue lavado y enjuagado repetidas veces, luego de lo cual se realizó una desinfección superficial con etanol 70 por ciento, durante 30 segundos, y posteriormente con una solución de hipoclorito de sodio (2 por ciento de Cl_2 activo), durante 10 minutos, y luego se enjuagó con agua estéril.

Los explantos utilizados fueron ápices caulinares de 0,7 a 1 mm de longitud, provenientes de yemas axilares, constituidas por el domo meristemático y 1 ó 2 primordios foliares.

Como medio básico de cultivo se utilizaron las sales minerales descritas por Boxus (1974), con el agregado de los siguientes compuestos orgánicos (mg/l): ácido nicotínico, 0,5; piridoxina.HCl, 0,5; tiamina.HCl, 0,1; glicina, 2; mio-inositol, 100; glucosa, 40.000; agar, 8.000; $0,5 \times 10^{-6}$ M de ácido indolbutírico (IBA) y $0,3 \times 10^{-6}$ M de ácido giberélico (AG_3). El medio básico de cultivo se fraccionó en 4 partes, en cada una de las cuales se empleó una citocinina diferentes: 6 - (4 - hidroxil - 3 - metilbut - 2 - trans-enil) aminopurina (Z - zeatina) 6 (γ - γ - dimetilalil) aminopurina (2iP), 6 - benzilaminopurina (BAP) y 6 - furfurilaminopurina (Kin-Cinetina) en una concentración de 2×10^{-6} M.

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,6-5,9 con KOH 1 N y, luego de fraccionarlo, se lo esterilizó durante 20 minutos a 1.013 bares (b).

Los envases utilizados para el cultivo fueron tubos de ensayo de 20 x 120 mm, que contenían 10 ml de medio de cultivo cada uno.

Las condiciones termo y fotoperiódicas

de cultivo fueron de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y de 16 horas de luz suministrada por tubos de luz fluorescente blanca fría, con una irradiancia de $1,8 \text{ Wm}^{-2}$. Al cabo de 40 días de cultivo, se dio por terminada la experiencia y se midieron los siguientes parámetros:

- Número de hojas expandidas por explanto inicial.
- Número de folíolos por hoja expandida.
- Número de yemas totales por explanto inicial.
- Por ciento de explantos que diferenciaron yemas.
- Por ciento de explantos con raíces.
- Por ciento de explantos con callo basal, tipicado en dos clases según el tamaño (+: $0,5 \times 1 \text{ mm}$ y ++: $1 \times 1 \text{ mm}$).

Cada tratamiento contó con 15 explantos; la experiencia se repitió dos veces durante los meses de septiembre-octubre y marzo-abril.

El número de hojas expandidas por explanto inicial se analizó estadísticamente, utilizando al test no paramétrico de comparaciones múltiples de Friedman (Hollander y Wolfe, 1973).

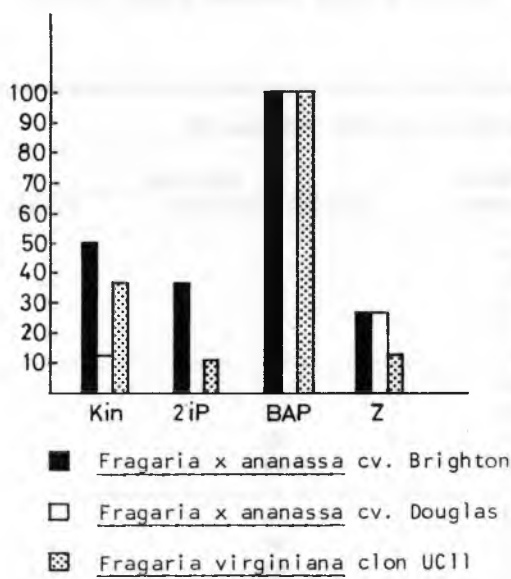


Figura 1: Explantos con yemas (%)

RESULTADOS Y DISCUSION

Pudo comprabarse que las citocininas ensayadas tienen una actividad diferencial en el proceso de morfogénesis. Así, BAP fue el compuesto más efectivo en la inducción de nuevas yemas en ambas especies, ya que todos los explantos utilizados sembrados en su presencia diferenciaron yemas (Figura 1) y en un número mayor al obtenido con las citocininas restantes (Figura 2). Iguaes resultados fueron obtenidos con BAP en explantos de un nudo de *F. x ananassa* Duch. cv. Red Gauntlet (Lee y de Fossard, 1977). También Boxus *et al.* (1978) considera que el medio por él sugerido para multiplicación, que contiene 1 mg/l de BAP, puede ser empleado para la micropropagación de unos 170 cultivares de frutilla, incluyendo diploides y octoploides. Además, en ápices caulinares de *Malus sylvestris* Mill. (Lundergan y Janick, 1980) y de "Citrange" cv. Carrizo (Kitto y Yang, 1981), BAP fue la citocinina más efectiva en la proliferación de yemas.

El número de yemas formadas por el cultivar refloreciente casi duplicó al que se originó en los de día corto, entre los cuales

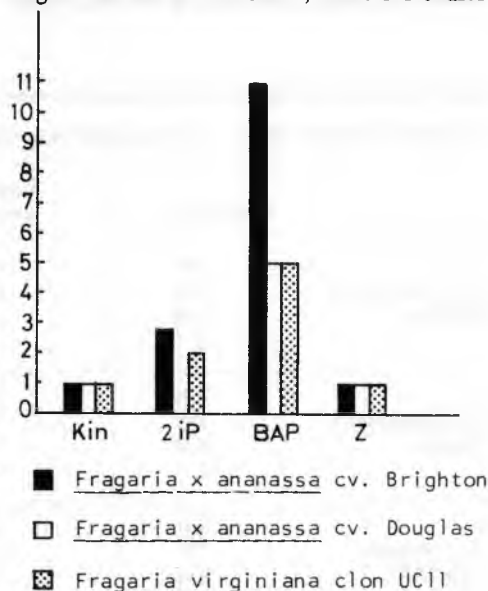


Figura 2: Número de yemas por explanto.

no existieron diferencias (Figuras 1 y 2). Igual efecto fue observado en otro cultivar reflorecente, Rabunda, de la misma especie (Caso y Radice, com. pers., 1982). En presencia de Z no existieron diferencias significativas entre especies; diferenciándose sólo una yema por explanto (Figuras 1 y 2).

Tanto con Kin como con 2iP, el cultivar reflorecente mostró un número mayor de explantos con yemas; Douglas fue el menor productor de nuevos órganos.

En ambas especies, el mayor porcentaje de explantos con callo basal se obtuvo con 2iP (Cuadro 1), aunque resultó de menor magnitud en *F. virginiana* L. En presencia de esta hormona, la producción de yemas varió de escasa a nula, a diferencia de lo observado con BAP donde la formación de callo fue de menor magnitud (Cuadro 1) estuvo seguida de la diferenciación de yemas (Figura 2). En ninguna de las especies hubo formación de callo basal en presencia de Kin, mientras que con Z sólo se observó en *F. x ananassa* Duch. (Cuadro 1). También ha sido observada una activa proliferación de callo, en presencia de 2iP en explantos de *Ararucaria araucana* (Mol.) C. Koch (Beniest y Debergh, 1976), en ápices caulinares de *Solanum x cur-*

tilobum (Grout *et al.*, 1976) y en callos de *Nicotina tabacum* L. (Tabhaz, 1977)

Se observó formación de raíces en ambas especies cuando se utilizó Kin o 2iP en el medio de cultivo, y con Z sólo en *F. virginiana* L. (Cuadro 1). Por el contrario, en presencia de BAP ninguna de las especies diferenció raíces durante el período de tratamiento. Este fenómeno se relacionaría con la mayor actividad de este regulador en la formación de yemas (Gráfico 2). Estos resultados coinciden con lo observado por Boxus *et al.* (1977) en numerosos cultivares de *F. x ananassa* Duch y 5 clones de *F. vesca* L. en los cuales obtuvieron formación de raíces con la sola omisión de BAP en el medio de cultivo.

La alta actividad de BAP en la inducción de nuevas yemas, así como la ausencia de raíces en su presencia, puede deberse a que, a pesar de que es rápidamente metabolizada, el compuesto formado es sumamente estable y posee actividad como citocinina, según lo hallado en callos de *Glycine max* L. Merrill (Wang *et al.*, 1981) y en cotiledones de *Beta vulgaris* L. (Letham, 1978).

También se observó diferencia entre los distintos reguladores, en lo que se refiere al número de hojas formadas durante el período

CUADRO 1: Efecto de las citocininas sobre la producción de raíces (%) y callo basal (%).

Citocinina	% explantos con raíces	Callo basal	
		% explantos con callo	Tamaño
<i>F. x ananassa</i> cv. - Brighton	Kin	0	—
	2iP	90	++
	BAP	60	+
	Z	10	+
<i>F. x ananassa</i> cv. Douglas	Kin	0	—
	2iP	90	++
	BAP	65	+
	Z	45	+
<i>F. virginiana</i> clon UC11	Kin	0	—
	2iP	90	+
	BAP	65	+
	Z	0	—

do del experimento. En los cultivares de *F. x ananassa* Duch., el número de hojas por explanto inicial, en presencia de Z, fue significativamente inferior al obtenido en *F. virginiana* L. (Cuadro 2). Por otra parte, la respuesta de *F. x ananassa* Duch. con Z fue menor a la obtenida con otras citocininas. Así, en el cv. Brighton, el número de hojas expandidas con 2iP y BAP fue significativamente diferente del logrado con Z y en el cv. Douglas Kin fue superior a Z (Cuadro 2). En *F. virginiana* L. la respuesta a Z no fue distinta de la obtenida con las citocininas restantes (Cuadro 2). Diferencias interespecíficas en la respuesta a una citocinina en callos de *Phaseolus* spp. fueron observadas por Mok *et al.* (1978), quienes posteriormente atribuyeron estos resultados a diferente metabolismo en cada una de las especies (Mok *et al.*, 1982).

Las hojas expandidas por los explantos durante el período del tratamiento fueron 1-, 2-, 3-foliadas, o con lámina reducida. Estos últimos se obtuvieron como respuesta a los tratamientos con BAP, y su frecuencia fue mayor en el cultivar refloreciente (Cuadro 2). Este fenómeno parece correlacionarse con la formación de un mayor número de yemas (Figura 2).

Con las citocininas restantes no se obser-

vó una actividad diferencial en los concerniente a la forma de las hojas expandidas, ya que la primera hoja en todos los tratamientos fue 3-foliolada, las siguientes fueron 1-folioladas en su mayoría, y algunas 2-folioladas. En los cultivares de *F. x ananassa* Duch. en presencia de Z la única hoja expandida fue normal (Cuadro 2).

Los resultados expuestos permitieron comprobar que es diferente la respuesta morfogénica que se puede obtener con tratamientos de idéntica concentración de distintas citocininas. Las diferencias se presentaron tanto en la producción de yemas y su morfología foliar como en la inhibición de la formación de raíces.

En el primer caso, se observaron diferencias intra e interespecíficas. Si bien BAP fue la citocinina más efectiva en los tres materiales ensayados, hubo gran diferencia en el número de yemas inducidas entre cultivares de una misma especie pero con distinto requerimiento fotoperiódico para floración. Otro tanto puede decirse con respecto a 2iP, la segunda citocinina en cuanto a efectividad en la formación de yemas. No se conoce que existan referencias acerca de una relación entre la capacidad regenerativa y la clase fotoperiódica del vegetal. Puede ser casual el he-

CUADRO 2: Efecto de las citocininas sobre el número y morfología de las hojas expandidas por explanto.

Citocinina		Número de hojas explanto	% hojas con lám. reducida	% hojas 1-foliadas	% hojas 2-foliadas	% hojas 3-foliadas
<i>F. x ananassa</i> cv. Brighton	Kin	2,7	0	48	4	48
	2iP	3,1	0	38	0	62
	BAP	3,1	51	2	0	47
	Z	1,3	0	0	0	100
<i>F. x ananassa</i> cv. Douglas	Kin	3,1	0	36	16	48
	2iP	1,7	0	16	16	68
	BAP	2,2	10	5	5	80
	Z	1,0	0	0	0	100
<i>F. virginiana</i> clon UC11	Kin	3,1	0	51	16	33
	2iP	2,2	0	35	20	45
	BAP	2,3	14	0	0	86
	Z	2,9	0	45	10	45

cho de que tanto Douglas como el clon UC11, que son de día corto, se comporten en forma similar en este tratamiento.

En lo que se refiere a la no formación de raíces, sólo BAP se comportó como un inhibidor efectivo. El hecho de poder regenerar una planta completa mediante el ajuste de un único balance hormonal resultaría interesante para la micropropagación de estas especies, siempre y cuando no vaya en detrimento del número y vigor de las yemas obtenidas.

Los resultados expuestos indican que, si bien puede considerarse exitosa la micropropagación de distintos cultivares de una misma especie o de especies cercanas de un mismo género, el balance hormonal del medio de cultivo deberá ajustarse en cada uno de los materiales experimentados, si se desea optimizar la formación de nuevas yemas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de los Ings. Agrs. María C. Pomar de Lo Sasso, Silvia Radice y Sergio Ochatt, y al Ing. Agr. Daniel H. Ginzo por la realización del análisis estadístico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Beniést, J. and P. Debergh, 1976. Nutritional and hormonal requirements for the growth of *Araucaria araucana* callus "in vitro". *Medid. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent*. 41: 1599-1610.
- 2) Boxus, Ph. 1974. The production of strawberry plants by "in vitro" micropropagation. *J. Hort. Sci.* 49: 209-210.
- 3) Boxus, Ph., M. Quoirin and J. Laine, 1977. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. Cap. 1: 130. En: *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Ed. Reinert, J. and Bajaj, Y. Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg-New York, 803 pág.
- 4) Boxus, Ph., 1978. The production of fruit and vegetable plants by "in vitro" culture: Actual possibilities and perspectives. En: *Propagation of higher plants through tissue culture, a bridge between research and application*. Techn. Int. Center. US Dept Energy. Ed. Hughes K., Henke and M. Costantin.
- 5) Grout, B.; R. Westcott and G. Henshaw, 1976. Scanning electron microscope studies of multiple shoot production by meristem tip culture of *Solanum x curtilobum*. *Ann. Bot.* 41, 176: 1113-1116.
- 6) Hollander, M. and D. Wolfe, 1973. *Non parametric statistics methods*. John Wiley & Sons. New York-London-Sydney-Toronto. 503 pág.
- 7) Kartha, K., 1981. Meristem culture and cryopreservation. Methods and applications. En: *Plant tissue culture*. Part 1: 181. Methods and applications in agriculture. Ed. Thorpe, T. Academic Press, 379 pág.
- 8) Kitto, S. and M. Yang, 1981. "In vitro" propagation of carrizo citrange. *Hort. Sci.* 16 (3): 305-306.
- 9) Lee, E. C. and R. A. de Fossard, 1977. Some factors affecting multiple bud formation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchense). "In vitro". *Acta Horticultural* 78: 187-195.
- 10) Letham, D., 1978. Cytokinins. Cap. 4: 205. En *Phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise*. Vol. 1. Ed. Letham, D., Goodwin, P. and Higgins T. Elsevier, 641 pág.
- 11) Lundergan, C. and J. Janick, 1980. Regulation of apple shoot proliferation and growth "in vitro". *Hort. Res.* 20: 19-24.
- 12) Mok, M.; W. Mok and D. Armstrong, 1978. Differential cytokinin structure-activity relationships in Phaseolus. *Plant Physiol.* 61: 72-75.
- 13) Mok, M.; W. Mok; S. Dixon; D. Armstrong and G. Shaw, 1982. Cytokinin structure-activity and the metabolism of 6-(2-isopentyl) adenosine-8-¹⁴C in Phaseolus callus tissue. *Plant Physiol.* 70: 173-178.
- 14) Perez Afonso, J., 1979. Cultivo de Fresas. Ed. Ministerio de Agricultura. Publicaciones de extensión agraria. Madrid. 195 pág.
- 15) Skoog, F. and D. Armstrong, 1970. Cytokinins. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 21: 359-384.
- 16) Tabhaz, F., 1977. Activities of cytokinin in cucumber cotyledon assay compared with the tobacco callus bioassay. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 124: 255-264.
- 17) Terrine, C.; M. Doree; J. Guern and R. Hall, 1970. Uptake of cytokinins by *Acer pseudoplatanus* cells: enzymes of the deaminase type as regulators of the cytokinins level inside the cell. Sec. 11: 467. En: *Plant Growth substances*. Ed. Carr, D. Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg-New York, 837 pág.
- 18) Wang, T.; N. Everett; A. Gould and H. Street, 1981. Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. The effects of cytokinin. *Protoplasma* 106: 23-35.